

尿素 (Urea) 含量(酶法)检测试剂盒说明书

(微板法96样)

一、产品简介：

尿素(Urea) 又称碳酰胺，旧称尿素氮(BUN)，是哺乳动物和某些鱼类体内蛋白质代谢分解的主要含氮产物，也是目前含氮量最高的氮肥。

该试剂盒利用尿素在脲酶的作用下水解产生氨离子和二氧化碳，氨离子在碱性介质中与酚显色剂生成蓝色物质，该物质的生成量与尿素含量成正比。通过于640nm处检测该有色物质含量进而计算得出尿素氮含量。

二、试剂盒组分与配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体5.5mL×1瓶	-20℃保存	可-20℃分装冻存，尽量减少反复冻融。
试剂二	液体22mL×1瓶	4℃保存	
试剂三	试剂三A:1mL×3支 试剂三B:0.2mL×1支	4℃保存	临用前向一支试剂三A(1mL)中加入30 μL试剂三B(1mL:30 μL),混匀后再用去离子水稀释十倍(1:9)备用，避光保存，最好一周内用完。
标准管	粉体mg×2支	4℃保存	每支临用前加1mL去离子水溶解，即浓度为6mg/mL的尿素，检测前再用去离子水稀释20倍(50:950)即成0.3mg/mL(5mmol/L)的尿素。

三、所需仪器和用品：

酶标仪、96孔板、天平、移液器、离心机、水浴锅/金属浴/恒温培养箱、去离子水。

四、尿素(Urea) 含量检测：

建议正式实验前选取2个样本做预测定，了解本批样品和实验流程，避免样本和试剂浪费！

1、样本制备：

- ①液体样品：液体样品：澄清的液体可直接检测；若浑浊则离心后取上清液检测。
- ②细菌/细胞样本：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约500万细菌或细胞加入1mL生理盐水，超声波破碎细菌或细胞(冰浴，功率200W，超声3s，间隔10s，重复30次)；12000rpm 室温离心10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量(10^6):提取液(mL) 为500~1000:1的比例进行提取。

- ③组织样本：取约0.1g组织，加入1mL生理盐水，进行冰浴匀浆。4℃×12000rpm 离心10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量(g):提取液体积(mL)为1:5~10的比例进行提取。

2、上机检测：

- ①酶标仪预热30min，设置温度在37℃，设定波长到640nm。
- ②做实验前选取2个样本，找出适合本次检测样本的稀释倍数D（如：尿液样本可用蒸

馏水稀释100倍)。

③所有试剂解冻至室温，在EP管中依次加入：

试剂名称(μL)	测定管	空白管(仅做一次)	标准管(仅做一次)
样本	5		
去离子水		5	
标准品			5
试剂一	50	50	50
混匀，37℃反应10min。			
试剂二	200	200	200
试剂三	200	200	200
混匀，37℃孵育30min后，取出200 μL澄清液体至96孔板中，于640nm处读吸光值A, ΔA=A测定-A空白。			

【注】：1. 测定管A 值若超过1.5, 样本可用生理盐水或去离子水进行稀释，稀释倍数D 代入公式。

2. 若已知样本自身含有氨离子，可增加一个对照管(5 μL 样本+50 μL 去离子水，37℃反应10min后，再依次加入200 μL 试剂二和200 μL 试剂三，37℃反应30min 后读值，ΔA=A 测定-A 对照。若对照管值低于空白管值可以省略掉对照管的测定。

五、结果计算：

1、按液体体积计算：

$$\text{尿素(mg/L)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times 10^3 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空}}) \div V_1 \times D = 300 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空}}) \times D$$

$$\text{尿素(mmol/L)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空}}) \div V_1 \times D = 5 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空}}) \times D$$

$$\text{尿素氮(mmol/L)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空}}) \div V_1 \times 2 \times D = 10 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空}}) \times D$$

$$\text{尿素氮(mg/dL)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空}}) \div V_1 \times 2 \times 14 \div 10 \times D = 14 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空}}) \times D$$

2、按细胞数量计算：

$$\text{尿素(ng/10}^4\text{cell)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times 10^6 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空}}) \div (500 \times V_1 \div V) \times D = 600 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空}}) \times D$$

$$\text{尿素(nmol/10}^4\text{cell)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times 10^3 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空}}) \div (500 \times V_1 \div V) \times D = 10 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空}}) \times D$$

$$\text{尿素氮(nmol/10}^4\text{cell)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空}}) \div (500 \times V_1 \div V) \times 2 \times D = 20 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空}}) \times D$$

3、按样本质量计算：

$$\text{尿素(μg/g)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times 10^3 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空}}) \div (W \times V_1 \div V) \times D = 300 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空}}) \div W \times D$$

$$\text{尿素(μmol/g)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空}}) \div (W \times V_1 \div V) \times D = 5 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空}}) \div W \times D$$

$$\text{尿素氮(μmol/g)} = (C_{\text{标准}} \times V_{\text{标}}) \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空}}) \div (W \times V_1 \div V) \times 2 \times D = 10 \times \Delta A \div (A_{\text{标准}} - A_{\text{空}}) \div W \times D$$

W—— 取样质量，g；
V₁—— 加入样本体积，0.005mL；
V—— 提取液体积，1mL；
2—— 一分子尿素含有2个氮元素；
C_{标准}—— 尿素标准品浓度，0.3mg/mL 即 5mmol/L=5μmol/mL；
V—— 加入标准品体积，0.005mL；
14—— 元素分子量；
60.04—— 尿素分子量；
50—— 细胞数量，万；
D—— 稀释倍数，未稀释即为1。